

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09648

研究課題名(和文)骨肉腫に対するIGF受容体を標的とした新規キメラ抗原受容体T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Novel chimeric antigen receptor modified T cells against IGF receptor for osteosarcoma

研究代表者

西尾 信博 (Nishio, Nobuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00586430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たながん治療法として、キメラ抗原受容体(CAR)を用いた遺伝子改変T細胞療法(CAR-T療法)は有望であり、各種がんへの応用が期待されている。本研究では、骨肉腫の表面に高発現する抗原に対する新規キメラ抗原受容体遺伝子改変T細胞を作成するためのpiggyBacトランスポゾンベクターと、piggyBacトランスポゾン法を用いて高い導入効率を可能とする培養方法を開発した。本研究で開発したベクターと培養法を用いて作成した新規CAR-T細胞は、ヒト骨肉腫細胞に対して強力な細胞傷害性を発揮した。本研究により、骨肉腫に対する新規免疫療法の基盤データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Genetically modified T cell therapy using chimeric antigen receptor (CAR) (CAR - T therapy) has been shown to be promising as a new cancer treatment method, and application to various cancers is expected. In this study, we developed a piggyBac transposon vector for novel chimeric antigen receptor genetically modified T cells for the antigen expressed on osteosarcoma cells and our culture method enabling high transduction efficiency using the piggyBac transposon gene transfer method. The novel CAR-T cells in this study exerted potent killing activity against osteosarcoma cells. Based on this study, we could obtain baseline data of novel immunotherapy for osteosarcoma.

研究分野：小児血液がん

キーワード：キメラ抗原受容体 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児骨原発悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、小児の骨腫瘍の中でも50%以上を占めている。1970年代に多剤併用化学療法が導入されて以降全体の生存率は60-75%程度まで改善したが、この治療成績は20年以上改善がない。また肺転移をきたしやすく、局所再発を含めた再発例の根治率は10%程度しかない。さらに、従来の手術、放射線治療、化学療法による集学的治療は非常に侵襲が強く、副作用の少ない効果的な新規治療法が切望されてきた。最近米国から、神経芽腫細胞の表面に発現するガングリオシドであるGD2や、B細胞性血液悪性腫瘍の表面に発現するCD19分子を標的としたキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor; CAR)を遺伝子導入されたT細胞療法の有用性が報告された。特に最近報告された再発、治療抵抗性急性リンパ性白血病(ALL)を対象としたCD19 CAR発現T細胞(CD19 CAR-T細胞)を使用した臨床試験では、88%の奏効率に加え、非寛解例であっても投与後に腫瘍残存病変が消失するという、劇的な抗白血病効果が認められた。そのため、キメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変T細胞療法を他のがんにも応用する研究が海外で加速している。

2. 研究の目的

本研究は、CARを用いた遺伝子改変T細胞療法を骨肉腫にも応用するための基盤研究である。本研究では、骨肉腫の表面に発現するX受容体1(XR1)、X受容体2(XR2)を標的とした骨肉腫に対する有効性および安全性の高い新規治療法の開発を目的に、X特異的CAR(X CAR)を作製し、骨肉腫細胞に対するX CAR-T細胞の抗腫瘍効果を、in vitro、in vivoで評価する。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫細胞株の表面に発現するXR1とXR2の発現量をフローサイとメーターを用いて解析する。

(2) 骨肉腫の表面に発現するXR1とXR2の両方を標的とするリガンドXの特異的結合配列をクローニングし、X CAR発現トランスポゾンベクターを新規に合成する。

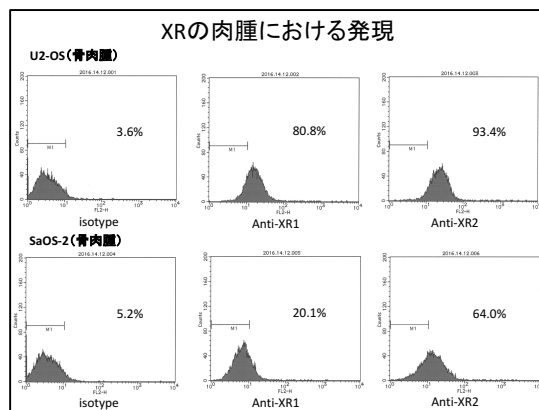
(3) GMP準拠T細胞培養法とpiggyBacトランスポゾン法を用いて、X CAR-T細胞を培養、樹立し、X CAR-T細胞上のX CAR発現量をフローサイトメーターを用いて解析する。

(4) XR陽性骨肉腫細胞株に対するX CAR-T細胞の抗腫瘍効果をin vitroおよびin vivoで検討する。

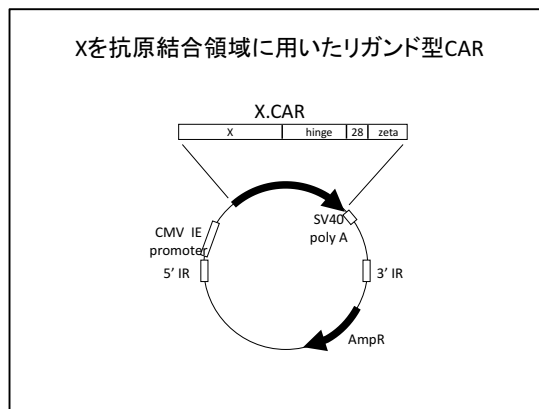
4. 研究成果

(1) 複数のヒト骨肉腫細胞株の細胞表面に発現しているXR1、XR2の発現量をフローサイ

トメーターにて解析した。複数の細胞株において、XR1とXR2の発現を確認した。一部の細胞株において、XR2は発現していたがXR1の発現はわずかであった(SaOS-2)。そのような腫瘍の場合にはXR1のみを標的とした場合には腫瘍がエスケープしてしまう可能性がある。X CAR-T細胞は、XR1とXR2の両方に対するリガンドXを持つため、XR1かXR2のどちらかの発現が低い場合にも細胞傷害性を発揮できるため、このような細胞の存在はX CAR-T細胞の有用性を示唆するものであった。

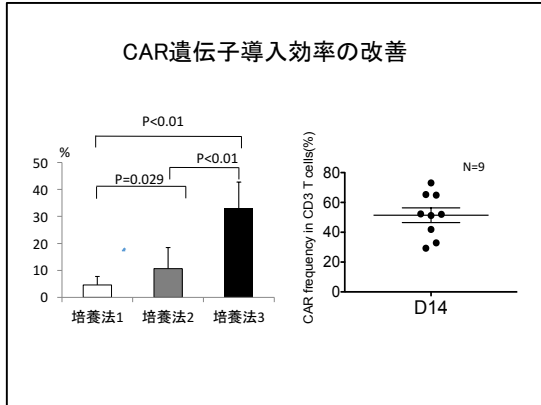


(2) XR1とXR2の両方を標的とするリガンドXの特異的結合配列をクローニングし、他のCARを発現するpiggyBacトランスポゾンベクターを遺伝子組換え技術を用いて改変し、X CAR発現トランスポゾンベクターを新規に合成した。

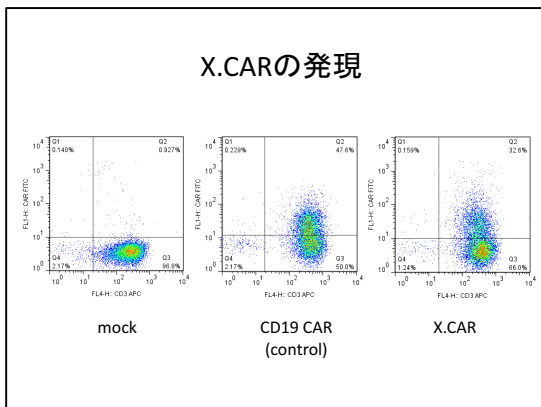


(3) piggyBacトランスポゾン法を用いた従来の培養方法を改良し、大幅に遺伝子導入効率を向上させる新規培養法を開発した。下図の培養法1では電ポレーション後のCAR-T細胞をOKT3と抗CD28抗体で刺激する従来の方法である。培養法2は電ポレーション後のCAR-T細胞に活性化自己リンパ芽球を加えて共培養したのちにOKT3と抗CD28抗体で刺激する。培養法3では、電ポレーション後のCAR-T細胞に、ウイルスペプチドをパルスした活性化自己リンパ芽球と共培養する。OKT3や抗CD28抗体は使用しない。培養法2や3の培養法により、電ポレーション後に電子刺激でダメージを受けたCAR-T細胞が、共培養した細胞から

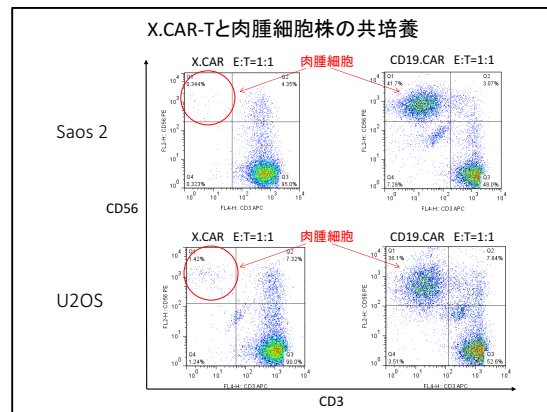
増殖刺激を受けたり、サイトカインをもらうことにより、CAR-T細胞のアポトーシス回避作用があることが考えられた。その結果、CAR遺伝子導入効率は平均30%以上まで上昇し、安定的なCAR発現を可能とした。さらに他のCARを用いた検討では、プラスミドの最適化により平均50%の導入効率を達成している。



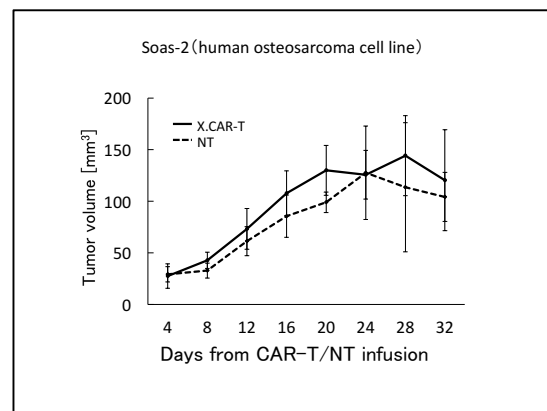
(4) 上記培養法で樹立した X. CAR-T 細胞の導入効率を、CAR の配列中に含まれるヒンジ部分の CH2CH3 ドメインを標的とした抗体を用いてフローサイトメーターで確認した。その結果下図に示すように30%程度の安定的なCARの発現を確認した。



(5) 樹立した X. CAR-T 細胞と XR1、XR2 発現ヒト骨肉腫細胞株を、エフェクター：ターゲット比 (E:T 比) が 1:1 になるように in vitro で共培養した。5 日間の共培養ののちにすべての細胞を回収し、残存細胞のうち T 細胞は抗 CD3 抗体を、腫瘍細胞は抗 CD56 抗体を用いて、フローサイトメーターを用いて解析した。コントロールの CD19. CAR-T 細胞は腫瘍細胞を傷害せず、腫瘍細胞と T 細胞が共存していたのに対して、X. CAR-T 細胞は強力に腫瘍細胞を傷害し、腫瘍細胞はほとんど消失した。このことより、X. CAR-T 細胞は抗原特異的に腫瘍細胞を傷害することが明らかとなった。



(6) X. CAR-T 細胞の in vivo での細胞傷害活性を調べるため、免疫不全マウスである NSG マウスの皮下に XR1、XR2 を発現する骨肉腫細胞株を注射した。その3日後にコントロール T 細胞または X. CAR-T 細胞をマウスの尾静脈から注射し、以後腫瘍のサイズを測定した。皮下注射された腫瘍は徐々に腫瘍を形成し、ヒト骨肉腫移植マウスが樹立できた。しかしながら、皮下腫瘍の大きさはコントロール T 細胞治療群と X. CAR-T 細胞治療群とで変わりなく、本皮下注射モデルでは X. CAR-T 細胞の腫瘍抑制効果は認められなかった。固形腫瘍では CAR-T 細胞が到達しにくく、浸潤しにくいことが指摘されており、他の治療と組み合わせるなどの工夫が必要かもしれない。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Morita D, Nishio N, Saito S, Tanaka M, Kawashima N, Okuno Y, Suzuki S, Matsuda K, Maeda Y, Wilson MH, Dotti G, Rooney CM, Takahashi Y, Nakazawa Y. Enhanced Expression of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor in piggyBac Transposon-Engineered T Cells. Mol Ther Methods Clin Dev. 査読あり 2018 Mar 16;8:131-40. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.12.003

② Nakazawa Y, Suzuki S, Nishio N. Regulation of adoptive immunotherapy. 臨床血液. 査読なし 2016;57(11):2373-80. DOI: 10.11406/rinketsu.57.2373

[学会発表] (計 3 件)

① Nishio N, Nakazawa Y et al. PiggyBac Mediated T cells Expressing anti CD19 Chimeric Antigen Receptor for a Clinical Trial. 第20回American Society of Gene and Cell Therapy(国際学会) 2017年

② Nishio N, Nakazawa Y et al. PiggyBac Mediated T cells Expressing Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor for a Clinical Trial. 第8回日本血液学会国際シンポジウム(国際学会) 2017年

③ Nishio N et al. Durable Remission After Salvage Chemotherapy with Combining Bortezomib and Vorinostat Followed by CD19 CAR-T Therapy in a Patient with MLL-rearranged ALL After Early Relapse Post Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 第59回米国血液学会(国際学会) 2017年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変T細胞の調製方法
発明者: 西尾信博、高橋義行、中沢洋三、田中美幸、盛田大介
権利者: 国立大学法人名古屋大学、国立大学法人信州大学
種類: 日本特許出願
番号: 2015-200458
出願年月日: 2015/10/8
国内外の別: 国内

名称: キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変T細胞の調製方法
発明者: 西尾信博、高橋義行、中沢洋三、田中美幸、盛田大介
権利者: 国立大学法人名古屋大学、国立大学法人信州大学
種類: 国際特許出願
番号: PCT/JP2016/079989
出願年月日: 2016/10/7
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 信博 (NISHIO, Nobuhiro)
名古屋大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 00586430

(2) 研究分担者

中沢 洋三 (NAKAZAWA, Yozo)
信州大学・医学部附属病院・小児科・教授
研究者番号: 60397312

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()